

การโคลนบางส่วนของยีน *Geranylgeranyl diphosphate synthase (JcGGPPS)* ของสับดูดำและการลดการแสดงออกของยีน *GGPPS* ในยาสูบด้วย antisense *JcGGPPS*
Partial Cloning of *Jatropha Geranylgeranyl Diphosphate Synthase (JcGGPPS)* and Down-regulation of Endogenous *GGPPS* of Tobacco by Antisense *JcGGPPS*

สกุรัตน์ สุวรรณโณ

สาขาการปรับปรุงพันธุ์พืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตกำแพงแสน ถนนมาลัยแมน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

พรศิริ หลิววนิช และสนธิชัย จันทร์เปรม^{A*}

ภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตกำแพงแสน ถนนมาลัยแมน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

Sakurat Suwanno

Program in Plant Breeding, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University,
Kamphaeng Saen Campus, Malaiman Road, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

Pornsiri Leewanich and Sontichai Chanprame^{A*}

Department of Agronomy, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University,
Kamphaeng Saen Campus, Malaiman Road, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

บทคัดย่อ

สับดูดำเป็นพืชน้ำมันที่มีศักยภาพสูงในการปลูกเพื่อผลิตเป็นน้ำมันไบโอดีเซล แต่น้ำมันจะประกอบด้วยสารพิษที่สำคัญ คือ สารฟอรับอลเอสเทอร์ ซึ่งจัดเป็นสารก่อมะเร็งชนิดหนึ่ง Geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPPS) เป็นเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์สารฟอรับอลเอสเทอร์ในสับดูดำ ดังนั้นเพื่อศึกษาบทบาทของยีน *GGPPS* จึงได้โคลนบางส่วนของยีน *GGPPS* โดยสกัดอาร์เอ็นเอจากเมล็ดสับดูดำพันธุ์โคราชมาทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *GGPPS* พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 592 นิวคลีโอไทด์ เมื่อตรวจสอบ

^ACenter for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Malaiman Road, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

*ผู้รับผิดชอบบทความ : agrstc@ku.ac.th

ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีความเหมือนกับยีน *GGPPS* ในสบู่ดำ 99 เปอร์เซ็นต์ จึงให้ชื่อแถบดีเอ็นเอนี้ว่า *JcGGPPS* จากนั้นถ่ายฝาก antisense *JcGGPPS* เข้าสู่ยาสูบ โดยใช้แบคทีเรียอะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ EHA-105 พบว่ามียาสูบ 4 ต้น ที่ได้รับยีนดังกล่าว และเมื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *GGPPS* ในต้นยาสูบทั้ง 4 ต้น โดยใช้เทคนิค real-time PCR พบว่ามีการแสดงออกของยีนลดลงมากที่สุด 3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับต้นยาสูบปกติ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์ในใบของยาสูบด้วยเทคนิค HPLC พบว่ามีปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์ลดลง 2.5 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับต้นยาสูบปกติ แสดงว่าการถ่ายยีน antisense *JcGGPPS* จากสบู่ดำเข้าสู่ยาสูบสามารถลดการแสดงออกของยีน *GGPPS* ของยาสูบ ส่งผลให้ปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์ลดลงด้วย

คำสำคัญ : สบู่ดำ; สารฟอร์บอลเอสเทอร์; geranylgeranyl diphosphate synthase (*GGPPS*); *Agrobacterium tumefaciens*; เทคนิค antisense

Abstract

Jatropha curcas is one of the potential biodiesel production plant. However, one serious problem is that the plant produces phorbol esters (PEs), a carcinogen. Geranylgeranyl diphosphate synthase (*GGPPS*) is a key enzyme in the phorbol esters biosynthesis. To study the role of *GGPPS* gene, the partial *GGPPS* gene was cloned by using RT-PCR from total RNA extracted from *Jatropha* seed cv. Korat and with the primer specific to *GGPPS* gene. The DNA fragment size of 592 bp was amplified. The sequence analysis indicated that the obtained cDNA had very high similarity (99 %) to *GGPPS* gene of *J. curcas*. We named this DNA fragment as *JcGGPPS*. The antisense *JcGGPPS* gene was introduced into tobacco by *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA-105. The four transgenic tobacco plants were produced. The analysis of *GGPPS* gene expression by real-time PCR showed that the lowest expression level of endogenous *GGPPS* gene in transformed plants was about 3 folds lower than that of the control plant. The phorbol esters contents of transformed tobacco plants were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). It was found that the PEs content of the transformed tobacco was also 2.5 folds lower than that of the control. It was indicated that the antisense *JcGGPPS* gene was an effective down-regulating in the expression of endogenous *GGPPS* gene and reducing the PEs content of tobacco.

Keywords: *Jatropha curcas*; phorbol ester; geranylgeranyl diphosphate synthase (*GGPPS*); *Agrobacterium tumefaciens*; antisense technique

1. บทนำ

สบู่ดำเป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่ง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* L. อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae

มีชื่อสามัญ คือ barbados nut, physic nut และ purging nut พืชที่อยู่ในสกุล *Jatropha* นี้มีมากกว่า 470 ชนิด (species) [1] สบู่ดำเป็นพืชที่สามารถเจริญ

ได้ในสภาวะที่แห้งแล้งและทนทานต่อโรคพืช จึงสามารถกระจายพันธุ์ได้ดีในหลายเขตภูมิอากาศ ทั้งในเขตร้อน เขตกึ่งร้อน เขตอบอุ่น และเขตที่มีปริมาณน้ำฝนต่ำ [2] สบู่ดำเป็นพืชที่มีประโยชน์ทั้งทางตรงและทางอ้อม เช่น ปลูกเป็นรั้วล้อมรอบพื้นที่ปลูกพืชเศรษฐกิจหลัก เพื่อป้องกันสัตว์เลื้อยเข้ามาทำความเสียหายต่อพืช ช่วยลดการกัดเซาะของหน้าดินจากลมและน้ำ และเป็นแหล่งพลังงานทดแทน โดยสามารถนำเมล็ดมาสกัดน้ำมันเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลทดแทนเชื้อเพลิงที่มาจากฟอสซิล ทำให้หลายประเทศรวมทั้งประเทศไทยสนใจศึกษาและปลูกสบู่ดำมากขึ้น [3] นอกจากนี้กากเมล็ดที่เหลือจากการบีบน้ำมัน (cake) มีโปรตีน 22-28 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่ากากถั่วเหลือง ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ แต่น้ำมันและกากสบู่ดำมีสารหลายชนิด เช่น สารเคอร์ซิน (curcun) ทริปซินอินฮิบิเตอร์ (trypsin inhibitor) เลคติน (lectin) ซาโปนิน (saponin) ไฟเตต (phytate) และสารฟอรับอลเอสเทอร์ (phorbol ester) [4,5] โดยสารฟอรับอลเอสเทอร์เป็นสารพิษหลักที่พบมากสุดในเมล็ด ซึ่งเป็นอุปสรรคสำคัญที่ทำให้การนำน้ำมันรวมถึงกากที่เหลือจากการสกัดน้ำมันมาใช้ประโยชน์ [6] นอกจากนี้สารฟอรับอลเอสเทอร์ยังส่งเสริมให้เกิดเนื้องอก (tumor promoting activity) ในคนและสัตว์ โดยจะไปกระตุ้น protein kinase C ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์การสังเคราะห์โปรตีนและดีเอ็นเอผิดปกติไป นอกจากนี้ยังส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ (lymphocyte) และชักนำให้เกิดลิ้มเลือดได้ [7]

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการวิจัยที่สามารถอธิบายอย่างชัดเจนถึงวิถีชีวสังเคราะห์ของสารฟอรับอลเอสเทอร์ [8] แต่เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าสารฟอรับอลเอสเทอร์เป็นอนุพันธ์ของสารทิกเลน

(tigliane) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของสารในกลุ่มไดเทอร์พีนส์ (diterpene) และอยู่ในกลุ่มเทอร์พีนอยด์ (terpenoid) ดังนั้นความเข้าใจในวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์อาจนำมาใช้ในการอธิบายและทำนายยีนที่น่าจะเกี่ยวข้อง กับวิถีชีวสังเคราะห์สารฟอรับอลเอสเทอร์ ซึ่งการสังเคราะห์โปรตีนในสบู่ดำที่เป็นผลมาจากการทำงานของยีนต่าง ๆ ทำให้คาดหมายว่าเอนไซม์ที่มีส่วนสำคัญในการสังเคราะห์สารฟอรับอลเอสเทอร์ คือ geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPPS) โดย Lin และคณะ [9] ศึกษาลักษณะและหน้าที่ของยีน GGPPS ที่สร้าง GGPPS ซึ่งเป็นเอนไซม์ในวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์ โดยมี geranyl diphosphate (GPP) เป็นสารตั้งต้นในการสร้างสาร geranylgeranyl diphosphate (GGPP) และเมื่อโคลนยีนดังกล่าวจากเมล็ดสบู่ดำด้วยเทคนิค RACE พบว่า cDNA ของยีนนี้ประกอบด้วย 1,414 นิวคลีโอไทด์ และการแสดงออกของยีนใน *Escherichia coli* พบว่ายีน GGPPS ของสบู่ดำจะทำให้มีการสะสมของเบตาแคโรทีน โดยสังเกตได้จากสีโคลนของแบคทีเรียที่เปลี่ยนจากสีขาวไปเป็นสีเหลือง ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ คือ การโคลนบางส่วนของยีน GGPPS จากสบู่ดำ และถ่าย antisense ของยีนนี้เข้าสู่ยาสูบ เพื่อลดการแสดงออกของยีน GGPPS รวมทั้งการลดปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นในยาสูบดังกล่าว ซึ่งจะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำให้มีการสร้างสารฟอรับอลเอสเทอร์น้อยลงหรือไม่มีเลยโดยใช้เทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพต่อไปในอนาคต

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอและการสังเคราะห์ first strand cDNA

นำเมล็ดสบู่ดำพันธุ์โคราชจากแปลงทดลองของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

มาสกัดอาร์เอ็นเอตามวิธีการของ Laksana และ Chanprame [10] และตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่ได้ด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer 8000 (Eppendorf) ที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร แล้วกำจัดจีโนมคติเอ็นเอออกจากตัวอย่างด้วยเอนไซม์ DNase I (Fermentas, USA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นสังเคราะห์ cDNA โดยการทำให้ reverse transcription (RT) ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase ตามคำแนะนำของบริษัท ThermoScientific (สหรัฐอเมริกา) โดยใช้ไพรเมอร์ที่เป็น oligo dT primer เป็นตัวตั้งต้นในการสังเคราะห์สาย ดีเอ็นเอ

2.2 การโคลนบางส่วนของยีน *JcGGPPS* จากสบู่ดำ

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์บางส่วนของยีน *GGPPS* จากสบู่ดำ โดยเลือกใช้ยีนที่มีรายงานงานในฐานข้อมูล GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) เป็นแม่แบบ (ตารางที่ 1) นำ first strand cDNA เข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบางส่วนของยีน *GGPPS* โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ 10x PCR buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร สารละลาย dNTP mix เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร *Taq* polymerase เข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อเป็น 10 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยนำส่วนผสมต่าง ๆ ใส่เครื่อง Thermo cycler (Biometra®, Germany) ตั้งโปรแกรมสำหรับปฏิกิริยา pre-denature อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส

นาน 3 นาที denature อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที annealing ในช่วงอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำโปรแกรม denature ถึง extension จำนวน 30 รอบ และ final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นตรวจสอบผลผลิตที่ได้ด้วยการทำอากาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ตัดแถบดีเอ็นเอออกมา และแยกสกัด ดีเอ็นเอออกจากชิ้นเจลด้วย GenePflow™ Gel/PCR Kit (Geneaid) แล้วส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยบริษัท 1st base laboratory (มาเลเซีย) จากนั้นเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast>)

2.3 การสร้างพลาสมิดสายผสมที่มีบางส่วนของยีน *antisense JcGGPPS*

โคลนบางส่วนของยีน *JcGGPPS* แบบ antisense โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนซึ่งออกแบบให้มีส่วนปลายของไพรเมอร์มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *SpeI* เพื่อใช้บังคับทิศทางการแปลรหัสเมื่อเชื่อมต่อกับโปรโมเตอร์และเทอร์มินเตอร์ จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เป็น antisense ของบางส่วนของยีน *JcGGPPS* ที่สังเคราะห์ได้เข้าสู่ pGEM-T easy® vector (Promega, USA) และถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยเทคนิค heat shock จากนั้นตัดพลาสมิดที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *SpeI* (Promega) เพื่อให้ได้ชิ้น antisense *JcGGPPS* นำชิ้นดีเอ็นเอนี้สอดแทรกเข้าไปในพลาสมิด pCAMBIA 1304 ซึ่งมียีนรายงานผล (*gus*) และยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ hygromycin (*hpt*) เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือก ให้ชื่อพลาสมิดสายผสมนี้ว่า pCAMBIA1304 anti-*JcGGPPS* จากนั้นนำพลาสมิดสายผสมเข้าสู่แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์

EHA 105 โดยวิธี freeze-thaw ตรวจสอบโคลนที่คาดว่าได้รับพลาสมิดสายผสมด้วยเทคนิคพีซีอาร์และปฏิกิริยา double digestion ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *NcoI* และ *SpeI* ตรวจสอบผลโดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วส่งวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับคลีโอไทด์

2.4 การถ่ายยีนบางส่วนของยีน antisense *JcGGPPS* จากสบูดำเข้าสู่ยาสูบ

ตัดใบยาสูบที่ได้จากต้นที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและปลอดเชื้อให้เป็นชิ้นขนาดประมาณ 0.5×0.5 ตารางเซนติเมตร preculture บนอาหารสูตร MS ร่วมกับ BA เข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร (MS1) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำให้เกิดบาดแผลโดยการ sonication (Bandelin Electronic - DT52; 60/240 W) นาน 1 นาที แล้วนำไปปลูกเชื้อโดยการเลี้ยงร่วมกับเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียอะโกรแบคทีเรีย และเติมสารละลาย acetosyringone เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด แล้วย้ายชิ้นส่วนพืชมาซบด้วยกระดาษทิชชูที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไป co-culture บนอาหาร MS1 ที่ผสม acetosyringone เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในที่มืด เป็นเวลา 2 วัน เมื่อครบเวลาจึงล้างเชื้อออกจากชิ้นส่วนพืชด้วยอาหารเหลวสูตร MS1 ที่ผสมสารปฏิชีวนะ cefotaxime เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ย้ายชิ้นส่วนพืชไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS1 ที่มีสารปฏิชีวนะ cefotaxime เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นย้ายไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS1 ร่วมกับสารปฏิชีวนะ cefotaxime เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารปฏิชีวนะ hygromycin เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตัดยอดที่พัฒนาขึ้นจากแผ่นใบไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต

เพื่อชักนำให้พืชพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ต่อไป [11] จากนั้นตรวจสอบประสิทธิภาพของการถ่ายยีนด้วยวิธี GUS histochemical assay [12] การมีอยู่ของยีน *gus* และ *hpt* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค real-time PCR

2.5 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GGPPS* ของยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมด้วยเทคนิค real-time PCR

สกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมที่ตรวจสอบแล้วว่ามีส่วนของ antisense *JcGGPPS* แล้วนำไปสังเคราะห์เป็น first strand cDNA นำ first strand cDNA ที่ได้มาวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *GGPPS* ด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้ยีน *actin* เป็น reference gene (ตารางที่ 1) ส่วนผสมของปฏิกิริยาปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2x SensiFAST SYBR No-ROX Mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร forward primer และ reverse primer เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ชนิดละ 0.8 ไมโครลิตร first strand cDNA เข้มข้น 300 นาโนกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ DEPC-treated water ปริมาตร 7.4 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนด้วยเครื่อง Mastercycler® eprealplex บริษัท Eppendorf ตั้งโปรแกรมสำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ denature อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที annealing อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที จำนวน 45 รอบ จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาการแสดงออกของยีนเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (control) โดยแต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ (technical replication)

2.6 การวิเคราะห์สารฟอรับอลเอสเทอร์

เก็บตัวอย่างใบของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนและปลูกในสภาพโรงเรือน นำไปอบให้แห้งที่

อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปดัดให้ละเอียด นำมาสกัดสารด้วย เครื่องสกัด Soxhlet extractor (Buchi B-811) ตัวอย่างละ 4 กรัม โดยใช้ methanol ชนิด HPLC grade เป็นตัวทำละลาย ใช้เวลาในการสกัด 4 ชั่วโมง นำไปทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง rotary evaporator จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์ ชนิด DHPB โดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) รุ่น Waters 600 (Photo-diode Array Detector: 280 nm; Symmetry C18 Column ขนาด 3.9x150 mm อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์ คือ 20 ไมโครลิตร กรองด้วยเมมเบรนชนิด ไนลอนขนาดรูกรอง 0.5 ไมโครเมตร ใช้สารฟอรับอล

เอสเทอร์ ชนิด TPA (Sigma) เป็นสารมาตรฐานในการสร้าง calibration curve เฟสเคลื่อนที่ คือ อะซิโตไนโตรล (acetonitrile, HPLC grade) และน้ำ (H₂O, HPLC grade) ผสมในอัตราส่วน 80 ต่อ 20 โดยปริมาตร อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที (mL min⁻¹) [13]

2.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ ความแปรปรวนทางสถิติ (analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง ทรีทเมนต์ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป R-Program version 3.4.3 เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan’s new multiple range test (DMRT) ที่ ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติ 95 %

Table 1 Primers used for amplifying the partial *GGPPS* and antisense *GGPPS*, reference gene (*actin*) for real-time PCR and for detection of transgenic tobacco (*gus* and *hpt*)

Primers	Sequences
GGPPS_F	5'-CCGTCCTGAACTCCCATTTA-3'
GGPPS_R	5'-AGCCGATCCAAGCTCAGTTA -3'
Actin_F	5'-TCGTGCTGGATTCTGGTGAT-3'
Actin_R	5'-GGAACCACCACTGAGCACAA-3'
GGPPS_F_Realtime	5'-GCAGTACCCTTGAACCATCC-3'
GGPPS_R_Realtime	5'-CGCCTACTAACTCACAGGCA-3'
Actin_F_Realtime	5'-ATGACATGGAGAAGATCTGGCATCA-3'
Actin_R_Realtime	5'-AGCCTGGATGGCAACATACATAGC-3'
Antisense_GGPPS_F	5'-CTAGACTAGTCCGTCCTGAACTCCCATTTA -3'
Antisense_GGPPS_R	5' -CATGCCATGGAGCCGATCCAAGCTCAGTTA-3'
gus_F	5'-AAACGGCAAGAAAAGCAGTC-3'
gus_R	5'-CAGGCACAGCACATCAAAGAG-3'
hpt-F	5'-CCTGAACTCACCGCGACG-3'
hpt_R	5'-AAGACCAATGCGGAGCATATA-3'

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การโคลนบางส่วนของยีน *JcGGPPS* และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากสับดูต้าได้ อาร์เอ็นเอรวมเข้มข้นประมาณ 500-2,000 นาโนกรัม ต่อไมโครลิตร เมื่อนำไปตรวจสอบคุณภาพพบว่า อาร์เอ็นเอรวมที่แยกได้มีคุณภาพดี พบแถบของ large และ small ribosomal RNA (รูปที่ 1a) จากนั้นนำ อาร์เอ็นเอรวมที่ได้มาสังเคราะห์เป็น first strand cDNA ด้วยปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ กับยีน *actin* เป็น internal control และไพรเมอร์ที่ จำเพาะกับบางส่วนของยีน *JcGGPPS* (ตารางที่ 1) พบ ชิ้นดีเอ็นเอซึ่งเกิดจากไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *actin* ที่ใช้เป็น internal control มีขนาดประมาณ 590 นิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 1b) ส่วนชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจาก

ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *JcGGPPS* มีขนาดประมาณ 592 นิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 1c) เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม คอมพิวเตอร์ โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast>) พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีค่าความเหมือน (identity) กับยีน *GGPPS* ของ *Jatropha curcas* (Accession number: AF062735) 99 เปอร์เซ็นต์ *Ricinus communis* (Accession number: L32134.1) 80 เปอร์เซ็นต์ *Nicotiana tabacum* (Accession number: GQ911584.1) 77 เปอร์เซ็นต์ *Populus trichocarpa* (Accession number: XM0063832721) 77 เปอร์เซ็นต์ และ *Theobroma cacao* (Accession number: TCM019156) 77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จึง ตั้งชื่อบางส่วนของยีนที่โคลนได้จากสับดูต้าว่า *JcGGPPS*

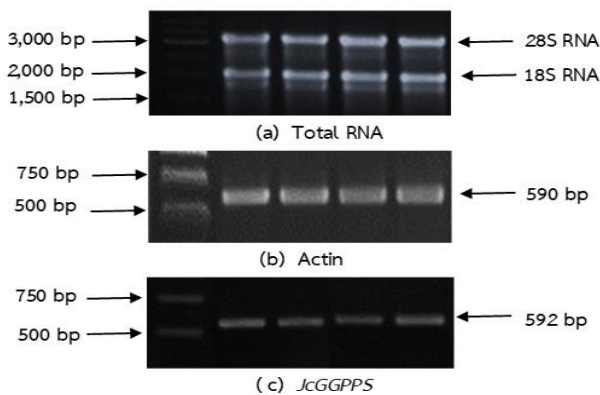


Figure 1 Total RNA and PCR products. (a) total RNA extracted from the mature seed, (b) 590 bp of *actin* gene and (c) 592 bp of *JcGGPPS* gene

3.2 การถ่ายยีนบางส่วนของยีน antisense *JcGGPPS* จากสับดูต้าเข้าสู่ยาสูบ

การถ่ายยีนบางส่วนของยีน antisense *JcGGPPS* ของสับดูต้าเข้าสู่ยาสูบ พบว่าหลังการถ่ายยีน เนื้อเยื่อมีการเจริญเติบโตและขยายขนาด เริ่มมีแคลลัสเกิดขึ้นบริเวณรอยตัด เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 2 แคลลัสเริ่มขยายใหญ่ขึ้น มีลักษณะแข็ง เกาะกันแน่นเป็นกลุ่ม ก้อนสีเขียวเมื่อย้ายลงอาหารคัดเลือกที่มีสารปฏิชีวนะ

hygromycin พบว่าเนื้อเยื่อบางส่วนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแต่มีแคลลัสเล็ก ๆ เจริญเติบโตอยู่ด้วย (รูปที่ 2c) เมื่อย้ายแคลลัสมาเพาะเลี้ยงบนอาหารชักนำต้น พบว่าแคลลัสสามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ โดยช่วงแรกส่วนบริเวณขอบของแคลลัสซึ่งได้รับอาหารเต็มที่จะมีการพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อสีเขียว กลม ผิวเรียบ ต่อมาเจริญกลายเป็นยอด จากนั้นตัดยอดไปเพาะเลี้ยง ในอาหารสูตร MS เกิดรากภายใน 1 สัปดาห์ (รูปที่

2d-2f) คาดว่าน่าจะเป็นต้นยาสูบที่ได้รับบางส่วนของ ยีน antisense *JcGGPPS* ของสบู่ดำ และเมื่อนำต้น ยาสูบเหล่านี้ไปปลูกในโรงเรือนเพาะชำก็สามารถ เจริญเติบโตเป็นปกติ เช่นเดียวกับต้นยาสูบที่ไม่ได้รับ การถ่ายยีน (รูปที่ 2g) สอดคล้องกับ [14] ได้ถ่ายยีน

antisense *LIM* เข้าสู่ยูคาริโอตส์ เพื่อลดการแสดงออก ของยีน *LIM* และยีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุม การสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ โดยลักษณะทางฟิโนไทป์เมื่อ สังเกตด้วยตาเปล่าไม่พบความแตกต่างระหว่างต้นที่ ได้รับการถ่ายยีนและต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

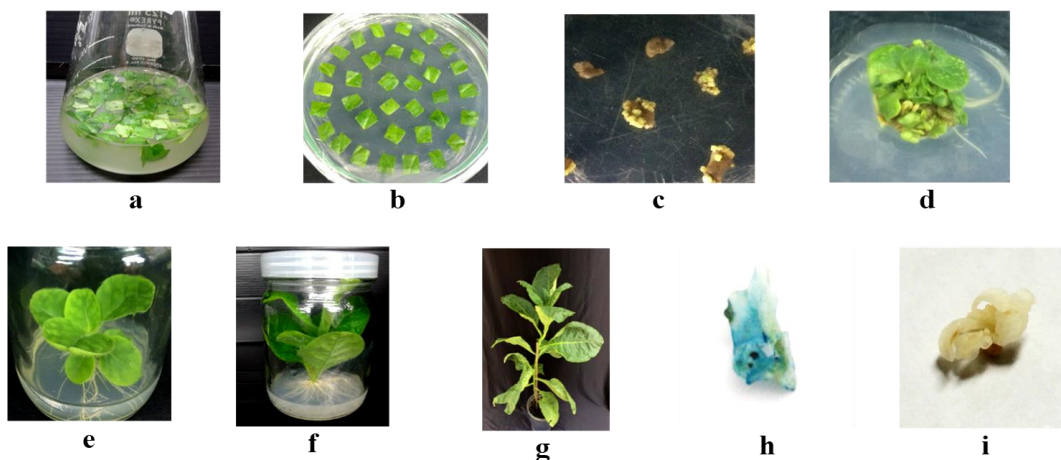


Figure 2 *Agrobacterium*-mediated transformation of tobacco using leaf explants; (a) the explants were inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 suspension, (b) co-cultivation on MS1 medium supplemented with 100 μ M acetosyringone, (c-d) putative transformed calli and shoots, (e-f) shoot and root proliferation on MS hormone-free medium, (g) transgenic tobacco plant in a greenhouse (h) positive GUS assay of the transgenic shoot and (i) non-transgenic shoot with negative GUS staining

การตรวจสอบผลการถ่ายยีนเบื้องต้นด้วย วิธี GUS histochemical assay พบว่าแบคทีเรีย อะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA 105 สามารถส่งถ่าย ยีน *gus* เข้าไปในชิ้นส่วนของพืช โดยสังเกตได้จากการ ติดสีน้ำเงินของชิ้นส่วนพืช (รูปที่ 2h) ส่วนยาสูบที่ไม่ได้ รับการถ่ายยีนไม่มีการติดสีน้ำเงิน (รูปที่ 2i) และเมื่อ ตรวจสอบการมีอยู่ของบางส่วนของยีน antisense *JcGGPPS gus* และ *hpt* ในจีโนมของยาสูบด้วยเทคนิค พีซีอาร์ พบว่ามียาสูบ 4 ต้น เกิดแถบดีเอ็นเอของยีน *GGPPS* ขนาด 592 นิวคลีโอไทด์ ยีน *gus* ขนาด 919

นิวคลีโอไทด์ และยีน *hpt* ขนาด 800 นิวคลีโอไทด์ (รูปที่ 3a)

3.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *GGPPS* ของยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนบางส่วนของยีน antisense *JcGGPPS*

วิเคราะห์การแสดงออกของยีน *GGPPS* ของยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนบางส่วนของยีน antisense *JcGGPPS* ด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้ระดับ การแสดงออกของยีน *actin* เป็นค่าอ้างอิง พบว่าการ แสดงออกของยีนลดลงมากที่สุดประมาณ 3 เท่า ในต้น

T₂ ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (รูปที่ 3b) แสดงว่าการถ่ายยีนบางส่วนของยีน antisense *JcGGPPS* เข้าสู่ยาสูบเพื่อยับยั้งหรือลดการแสดงออกของยีนนั้น ชิ้นส่วนยีนสามารถแทรกเข้าสู่จีโนมของพืชได้ และเมื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ antisense *JcGGPPS* (Antisense_GGPPS_F และ Antisense_GGPPS_R, ตารางที่ 1) ก็พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอผลผลิตทั้งจากยาสูบที่เป็นต้นควบคุมและต้นยาสูบถ่ายยีน (รูปที่ 3a) แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *GGPPS* ของยาสูบเองมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *JcGGPPS* เมื่อเกิดกระบวนการลอกรหัสพันธุกรรมจึงเกิด mRNA 2 ชนิด ที่เป็นคู่สมกัน เส้นหนึ่งเป็น mRNA ที่ใช้ antisense *JcGGPPS* เป็นแม่แบบ และอีกเส้นใช้ *GGPPS* ของยาสูบเป็นแม่แบบ mRNA ที่เป็นคู่สมกันนี้จะเข้ามาจับคู่กันทำให้เกิด mRNA เส้นคู่ ซึ่งจะถูกตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ส่งผลให้อาร์เอ็นเอถูกทำลายซึ่งทำให้ไม่สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนหรือเอ็นไซม์ เมื่อตรวจสอบการมีอยู่ของ mRNA ของยีน *GGPPS* โดยวิธีการ real-time PCR จึงพบว่ามีค่าการแสดงออกต่ำกว่าที่พบในต้นยาสูบปกติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hinjan [14] ที่ได้ถ่ายยีน antisense *LIM* เข้าสู่ *Eucalyptus camaldulensis* โดยใช้อะโกรแบคทีเรีย สายพันธุ์ EHA 105 ที่มีพลาสมิด pCAMBIALIM แล้วตรวจสอบการแสดงออกของยีน *LIM* ด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าการแสดงออกของยีน *LIM* ลดลง 99.8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เช่นเดียวกับ Shan และคณะ [15] ที่ศึกษาการถ่ายยีน alcohol acetyltransferase (*AAT7*) แบบ antisense เข้าสู่เมล่อน เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *AAT1* และ *AAT2* ในเมล่อนที่แก่เต็มที่พบว่าการแสดงออกของยีนทั้งสองลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับ

การถ่ายยีน

3.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์ของยาสูบที่ได้รับ antisense *JcGGPPS*

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์ชนิด DHPB โดยใช้เทคนิค HPLC ใช้สารฟอรับอลเอสเทอร์ชนิด TPA เป็นสารมาตรฐานในการสร้าง calibration curve พบว่าค่า retention time ของสารฟอรับอลเอสเทอร์ ชนิด DHPB อยู่ในช่วง 6-12 นาที ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่า retention time ในการวิจัยของ Hass และ Mittelbach (2000) การวิเคราะห์ปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์จากต้นยาสูบที่ได้รับบางส่วนของยีน antisense *JcGGPPS* พบว่าโครมาโตแกรมของยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมปรากฏอยู่ในช่วง retention time ที่ 6-12 นาที (รูปที่ 4b-4c) ซึ่งเป็นช่วงเดียวกับสารฟอรับอลเอสเทอร์ชนิด DHPB จึงคาดว่าสารที่ตรวจพบในช่วง retention time 6-12 นาทีของต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมอาจเป็นสารฟอรับอลเอสเทอร์หรือเป็นสารในกลุ่มเดียวกับฟอรับอลเอสเทอร์ ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาอย่างละเอียดต่อไป และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณดังกล่าวของยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนซึ่งมีประมาณ 8.97 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ขณะที่ต้นยาสูบดัดแปลงพันธุกรรมมีประมาณ 3.43-6.94 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 4a) เช่นเดียวกับ Jassbi และคณะ [16] ที่ได้ยับยั้งการแสดงออกของยีน *Naggpps* ในยาสูบ ซึ่งมีผลให้ยาสูบมีการสร้างสาร HGL-DTG ลดลง โครงสร้างพื้นฐานของสารฟอรับอลเอสเทอร์ ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ซึ่งจะเข้าจับกับโครงสร้างด้วยพันธะเอสเทอร์ในตำแหน่งต่างกัน ส่งผลให้เกิดความหลากหลายของชนิดสารฟอรับอลเอสเทอร์ Haas และคณะ [17] รายงานว่าสารฟอรับอลเอสเทอร์ที่แยกได้จากน้ำมันสนุดามีทั้งหมด 6

ชนิด การทดลองครั้งนี้พบว่าลักษณะของโครมาโตแกรมของยาสูบเกิด 2 พีค (รูปที่ 5b) โดย Ahmed และ Salimon [7] รายงานเกี่ยวกับลักษณะของโครมาโตแกรมจากสปีด้าที่มาจากประเทศมาเลเซีย อินเดีย และ อินโดนีเซียว่าเกิดโครมา-โตแกรม 2, 4 และ 5 พีค

ตามลำดับ นอกจากนี้ Martinez-Herrera และคณะ [18] ยังพบว่าชนิดและปริมาณของสารฟอร်บอลเอสเทอร์ในสปีด้าขึ้นอยู่กับ จีโนไทป์และลักษณะของภูมิอากาศด้วย

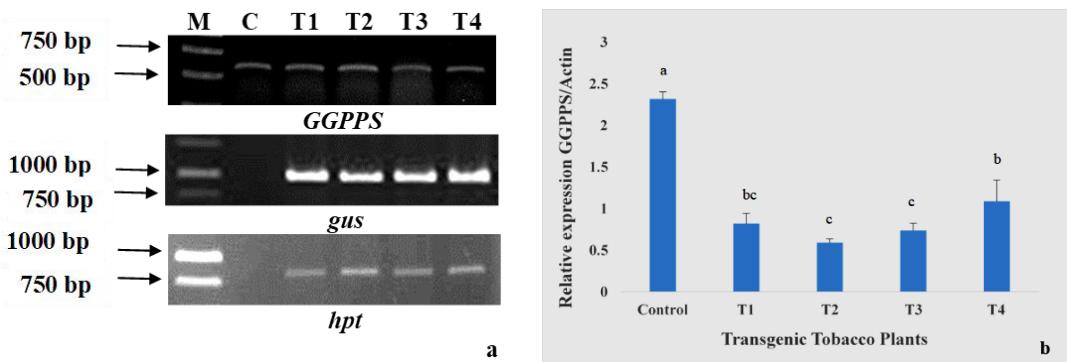


Figure 3 The presence of the transgenes and expression levels of *JcGGPPS* in transgenic tobacco plants (a) the PCR product derived from the reaction with specific primers to various transgenes in transgenic tobacco plants: 592 bp of *GGPPS* gene fragment; 919 bp of *gus* gene fragment and 800 bp of *hpt* gene fragment (lane M: 1 kb DNA marker, lane 2: non-transformed plant (negative control, C) and lanes 3-6: transgenic tobacco plants, T1-T4) and (b) the relative expression levels of *JcGGPPS* cDNA in transgenic tobacco plants (T1-T4) and non-transformed control plant. The boxes with different letters indicate significant differences at $p < 0.05$ according to DMRT.

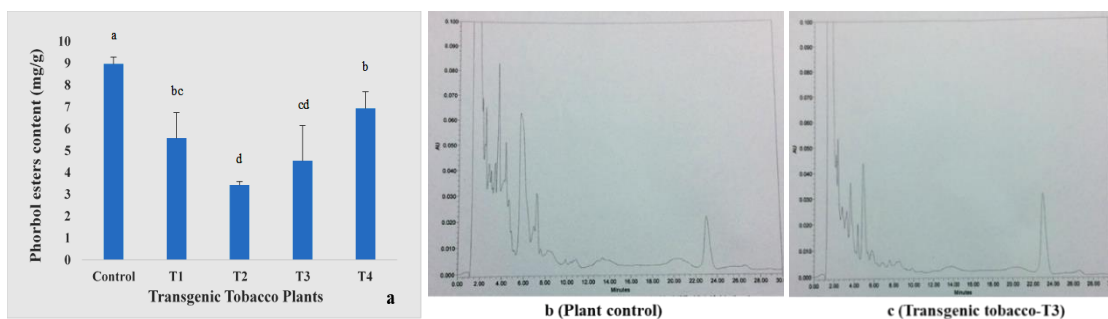


Figure 4 Phorbol esters content and chromatogram of transgenic tobacco plants (a) phorbol esters content in leaves of transgenic and the control tobacco plants. The boxes with different letters indicate significant differences at $p < 0.05$ according to DMRT (b) HPLC chromatogram of phorbol esters of control and (c) transformed tobacco plant line T3.

การศึกษานี้ได้วิเคราะห์ปริมาณของสารฟอร์บอลเอสเทอร์จากใบของยาสูบแทนการวิเคราะห์จากเมล็ดที่ปฏิบัติในหลอดทดลอง เนื่องจากสารตั้งต้นของสารฟอร์บอลเอสเทอร์สังเคราะห์จากส่วนต่าง ๆ เช่น ผลหรือใบ และส่งไปเก็บสะสมภายในเมล็ด เช่นเดียวกับยาสูบที่มีการสังเคราะห์สารพิษต่าง ๆ ภายในรากและส่งไปยังส่วนต่าง ๆ ของพืช [19] นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ที่สำคัญสำหรับกระบวนการสังเคราะห์สารฟอร์บอลเอสเทอร์ คือ GGPPS โดยมี isopentenyl diphosphate (IPP) และ farnesyl (FPP) เป็นสารตั้งต้นในการสร้างสาร geranylgeranyl diphosphate (GGPP) [20] การศึกษาครั้งนี้พบว่าการยับยั้งการแสดงออกหรือการทำให้แสดงออกของ endogenous GGPPS ในใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนแบบ antisense ลดลง มีผลทำให้ปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์ลดลงด้วย เป็นข้อมูลที่บ่งชี้ว่ายีน GGPPS มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์สารฟอร์บอลเอสเทอร์

4. สรุป

การโคลนบางส่วนของยีน *JcGGPPS* จากหลอดทดลองพบยีนขนาด 592 นิวคลีโอไทด์ เมื่อตรวจสอบความเหมือนของยีนที่แยกได้กับข้อมูลของยีนในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความคล้ายกับยีน *GGPPS* ของหลอดทดลอง และยาสูบ ตามลำดับ เมื่อนำบางส่วนของยีน *JcGGPPS* มาถ่ายยีนเข้าสู่ยาสูบแบบ antisense มียาสูบ 4 ต้น ที่ได้รับการถ่ายยีน เมื่อนำมาวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *GGPPS* ของยาสูบเองด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนมีการแสดงออกลดลงประมาณ 3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และการวิเคราะห์ปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์ลดลง การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการถ่ายยีนบางส่วนของยีน *JcGGPPS* จาก

หลอดทดลองในลักษณะที่เป็น antisense เข้าสู่ยาสูบสามารถลดหรือยับยั้งการแสดงออกของยีน *GGPPS* ของยาสูบ ส่งผลให้ปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์ลดลงด้วย ในอนาคตจึงสามารถใช้ antisense *JcGGPPS* ถ่ายเข้าสู่หลอดทดลองเพื่อปรับปรุงพันธุ์หลอดทดลองให้มีการสร้างสารดังกล่าวให้น้อยลงหรือไม่มีเลย ซึ่งจะช่วยให้ลดต้นทุนในการนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ และทำให้การใช้ใบโอดิเซลจากพืชชนิดนี้มีความปลอดภัยมากขึ้นรวมถึงเป็นมิตรกับสภาพแวดล้อมอีกด้วย

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์วิทยาการขั้นสูงเพื่อเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ภายใต้โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร และภาควิชาพืชไร่ภาคเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ทำวิจัย

6. References

- [1] Lueang-a-papong, P., 2006, *Jatropha* for biodiesel, Matchon Public Company, Ltd., Bangkok. (in Thai)
- [2] Heller, J., 1996, *Physic Nut – Jatropha curcas* L. – Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops, Doctoral Dissertation, Institute of Plant Genetic and Crop Plant Research, Gatersleben, Germany & International Plant Genetic Resource Institute, Rome.
- [3] Devappa, R.K., Makkar, H.P.S. and Becker, K., 2010a, *Jatropha* toxicity: A review, J.

- Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev. 13: 476-507.
- [4] Devappa, R.K., Makkar, H.P.S. and Becker, K., 2010b, Optimization of conditions for the extraction of phorbol esters from *Jatropha* oil, *Biomass Bioenerg.* 34: 1125-1133.
- [5] Yunping, B., Ha, B.T.N., Eunice, Y., Chueng, L. L. and Yan, H. , 2012, Light induced degradation of phorbol esters, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 84: 268-273.
- [6] Kaewsuriwong, S., Comwien, J., Roytrakul, S. and Chulalaksananukul, W. , 2013, Proteomic techniques for analysis of toxin biosynthetic pathways in *Jatropha curcas*, *Thai J. Genet.* 6: 115-127. (in Thai)
- [7] Ahmed, W.A. and Salimon, J. , 2009, Phorbol esters as constituents of tropical *Jatropha curcas* oil. *Eur. J. Sci. Res.* 31: 429-436.
- [8] Devappa, R.K., Makkar, H.P.S. and Becker, K., 2011, *Jatropha* diterpenes: A review, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88: 301-322.
- [9] Lin, J., Jin, Y., Zhou, X. and Wang, J.Y., 2010, Molecular cloning and functional analysis of the gene encoding geranyl geranyl diphosphate synthase from *Jatropha curcas*, *Afr. J. Biotechnol.* 9: 3342-3351.
- [10] Laksana, C. and Chanprame, S., 2015, A simple and rapid method for RNA extraction from young and mature leaves of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), *J. ISSAAS.* 21: 96-106.
- [11] Singlo, W., 2012, Transformation of Glyphosate Resistance Gene into Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) , Master Thesis, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 87 p. (in Thai)
- [12] Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W., 1987, GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, *EMBO J.* 6: 3901-3907.
- [13] Amkul, K., Laosatit, K., Somta, P., Shim, S., Lee, SH., Tanya P. and Srinives. P., 2017, Mapping of QTLs for seed phorbol esters, a toxic chemical in *Jatropha curcas* (L.), *Genes* 8: 205.
- [14] Hinjan, S. , 2010, Transformation of Antisense LIM Gene into *Camaldulensis* Dehnh, Doctoral Dissertation, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 120 p. (in Thai)
- [15] Shan, W., Zhao, C., Fan, J., Cong, H., Liang, S. and Yu, X., 2012, Antisense suppression of alcohol acetyltransferase gene in ripening melon fruit alters volatile composition, *Sci Hort.* 139: 96-101.
- [16] Jassbi, A.M., Gsae, K., Hettenhausen, C., Schmidt, A. and Baldwin, I., 2008, Silencing geranylgeranyl diphosphate synthase in *Nicotiana attenuata* dramatically impairs resistance to tobacco hornworm, *Plant Physiol.* 146: 974-986.

- [17] Haas, W. , Sterk, H. and Mittelbach, M. , 2002, Novel 12-deoxy-16-hydroxyphorbol diesters isolated from the seed oil of *Jatropha curcas*, J. Nat. Prod. 65: 1434-1440.
- [18] Martinez- Herrera, J., Siddhuraju, P. , Francis, G., Dávila-Ortíz, G. and Becker, K., 2006, Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico, Food Chem. 96: 80-89.
- [19] Katoh, A., Ohki, H., Inai, K. and Hashimoto, T., 2005, Molecular regulation of nicotine biosynthesis, Plant Biotechnol. J. 22: 389-392.
- [20] Okada, K. , Sato, T. , Nakagawa, T. , Kawamukai, M. and Kamiya, Y., 2000, Five geranylgeranyl diphosphate synthase expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in Arabidopsis, Plant Physiol. 122: 1045-1056.